

平山善章(長崎県)昭和30年10月15日生

授与年月日 平成3年3月31日

主論文 Histochemical localization of zinc and
copper in rat ocular tissues
(ラット眼組織における亜鉛と銅の組織
化学的局在)

論文内容の要旨

はじめに

亜鉛と銅は、生体の代謝過程において重要な役割をもつ痕跡性元素である。亜鉛の重要な金属酵素には、carbonic anhydrase, alkaline phosphatase, superoxide dismutase, alcohol dehydrogenase などがあり、銅の金属酵素としては、cytochrome oxidase, superoxide dismutase, uricase, DOPamine β -hydroxylase などがある。生化学的検索によれば、亜鉛は眼組織においては毛様体、網膜、脈絡膜に高濃度に含まれ、また銅は虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜、角膜に多く含まれるとされる。しかし、眼組織における亜鉛と銅の局在については、ほとんど報告されていない。そこでラット眼組織における亜鉛と銅の組織化学的検索を行った。

材料と方法

動物は Wistar 系ラットを用いた。

亜鉛の組織化学的検索：ラットを3群に分けた。第1群は生後4～15週の正常飼育ラット、第2群は亜鉛過剰ラットで、正常食及び30ppmの酢酸亜鉛を含んだ飲料水で3～4週間飼育した。第3群は離乳期より亜鉛欠乏食(日本クレア社)で6週間飼育した亜鉛欠乏ラット

トである。腹腔内に sodium pentobarbital 投与後、眼球を摘出し、100%冷エタノールで固定した。パラフィン切片を作成後、ジチゾン緩衝液に浸漬し、透徹後 glycerol gelatine にて封入した。

銅の組織化学的検索：生後4週、正常飼育ラットの眼球を摘出し、10%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作成した。切片をルベアン酸染色液、またはロダニン染色液に浸漬し、脱水、透徹後パーマウントに封入した。

結果

亜鉛：血清亜鉛は、第1群(正常群)で $120.20 \pm 6.91 \mu\text{g/dl}$ 、第2群(亜鉛過剰群)で $154.83 \pm 6.11 \mu\text{g/dl}$ 、第3群(亜鉛欠乏群)で $51.17 \pm 7.88 \mu\text{g/dl}$ であり、3群間に統計学的有意差を認めた ($P < 0.01$)。亜鉛の存在を示す赤紫色の陽性反応が、正常群と過剰群の網膜視細胞外節に認められた。正常群と過剰群の間には差がなかった。一方、欠乏群では同じ部位に弱い反応がみられた。他の部位の網膜や脈絡膜、強膜、視神経、角膜、結膜、水晶体、虹彩、毛様体には陽性反応がみられなかった。

銅：銅の存在を示す部位は、ルベアン酸法では緑黒色に、ロダニン法では赤褐色に染色された。両法はほぼ同様の結果を示した。角膜上皮で強い陽性所見を、角膜内皮で弱い反応を認めた。実質は明らかな所見を認めなかった。水晶体上皮、虹彩、毛様体、そして網膜では、外顆粒層、視細胞内節・外節、網膜色素上皮で陽性所見を認めた。また脈絡膜、強膜、視神経も銅の存在を示した。

考案ならびに結語

ジチゾン法や他の方法による亜鉛の組織化学的検索がなされてきたが、眼組織におけるものはまれである。蛋白表面に弱く結合したものは検出できるが、蛋白と固く結合した亜鉛イオンは、恐らくジチゾンイオンによっては検出されないと思われる。2分子のジチゾンイオンが1分子の亜鉛イオンに結合するのみであるため、本法の感度は幾分低い。従って直接観察するためには、比較的高濃度の亜鉛イオンが必要である。本研究では、亜鉛は網膜視細胞層で検出されたが、この部位は亜鉛の金属酵素の一つの alcohol dehydrogenase 活性が高いところである。亜鉛欠乏状態では、血清亜鉛値が低下するとともに、alcohol dehydrogenase の活性も明らかに低下する。これは亜鉛欠乏群において弱い陽性反応を示した今回の結果と一致した。虹彩、毛様体、脈絡膜には、亜鉛過剰群でさえも亜鉛を検出できなかったことより、亜鉛は特にレチノールの代謝過程に重要であると考えられた。

銅の組織化学的検索も古くより試みられてきたが、多くは銅過剰状態についてのものであり、正常眼組織

については検索されていない。今回の結果、ルベアン酸、ロダニン両法で同じ結果を得たことより、検出された部位に、より高濃度の銅が含まれていることが示された。銅の金属酵素の一つの superoxide dismutase は、角膜、水晶体、網膜、虹彩、毛様体でその活性が認められるとされ、組織化学的検索で角膜上皮、内皮で superoxide dismutase が検出された。また cytochrome oxidase の網膜における組織化学的局在は、視細胞内節、内・外網状層、神経節細胞層とされる。本研究で、銅の存在部位がこれらの金属酵素の存在部位と一致する部位もみられたが、内・外網状層や神経節細胞層では銅を検出できなかった。恐らくこれらの層では銅の濃度が低いと考えられる。しかし、銅は金属酵素の成分としてばかりでなく、他の生理機能をもつと考えられる。

論文審査の結果の要旨

平山善章は昭和55年8月、長崎大学医学部を卒業、56年5月医師国家試験に合格し、医籍に登録された。長崎大学医学部附属病院研修医、離島医療圏組合五島中央病院、国立嬉野病院、大分県立病院、長崎市立市民病院を経て、平成元年6月長崎大学医学部講師、平成2年9月より佐世保市立総合病院眼科医長となり現在に至っている。この間、眼科診療と眼科学研究に従事してきた。平山は、平成3年1月、主論文「Histochemical localization of zinc and copper in rat ocular tissues」(Acta Histochemica 89: 107-111, 1990) ほか参考論文24篇を添えて長崎大学大学院医学研究科委員会に審査を申請した。

長崎大学大学院医学研究科委員会は、これを定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、下記の通り審査委員を選定した。委員会では主査を中心として慎重に審査の上、平成3年3月20日に定例委員会でその結果を報告した。

本研究は眼組織における亜鉛と銅の分布を組織化学的に検索したものである。

動物は Wistar 系ラットを用いた。亜鉛の証明法としてジチゾン法を、銅の証明法としてルベアン酸法とロダニン法を用いた。亜鉛は蛋白質と強く結合してジチゾン法での検出率が低いので、正常ラットのほかに、亜鉛過剰飼料で飼育した亜鉛過剰症ラット、亜鉛欠乏飼料で飼育した亜鉛欠乏症ラットの3群について亜鉛の分布を確認する方法をとった。

その結果、亜鉛は網膜視細胞外節にのみ証明された。銅は、角膜上皮と内皮に、また水晶体上皮、虹彩、毛様体に証明された。網膜では、外顆粒層、視細胞内節・外節、色素上皮に分布し、脈絡膜、強膜、視神経にも分布が認められた。

視細胞外節に亜鉛が多いのはレチノールがこの部に存在し、この代謝に関与しているアルコール脱水素酵素が亜鉛を含む金属酵素であることに関係していると考えられる。また銅の存在部位は superoxide dismutase や cytochrome oxidase の存在部位に一致することが多いので、これらの酵素が銅を含むという事実に関係があると推測される。

研究科委員会は審査委員の報告に基づき、これを討論に付して審議した結果、本論文は眼組織における亜鉛と銅の局在、分布を初めて明らかにしたものであって、今後の眼組織における亜鉛と銅の研究に基礎的知識を提供できるもので、医学の進歩に貢献するところ大であって、学位に値するものと認め、合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	雨宮次生
	副査	教授	中根一穂
	副査	教授	池田高良